

網赤血球成熟物質に関する研究

第一編

家兎網赤血球の成熟に及ぼす牛肝エキスの作用について

岡山大学医学部病理学教室（主任：妹尾左知丸教授）

真 田 博 史

〔昭和33年11月24日受稿〕

I 緒 言

流血中の網赤血球数は、赤血球系血液疾患に於て骨髓機能の程度を察知するための因子として病態生理学的に重要な意義をもっていることは周知の如くである。而し、網赤血球は超生染による網状物質(SGF)を染め出すことによつてのみ認められるもので、SGFの本体は最近に至る迄不明のまま残されていた。

1936年 Caspersson は紫外線顕微鏡による核酸の研究から網状物質が核酸であることを示し¹⁾ 1947年には Dustin²⁾ により網赤血球がリボ核酸を含むことが証明され、その後妹尾^{3) 4) 5)} によつて Nile blue の超生染によつて生じた網赤血球に於てリボ核酸はSGFに含まれていることが明らかにされたが、彼はSGFは超生染によつて生じた Organellae の人工的凝集物であろうと想像した。一方 Simmel^{6) 7)} は暗視野でSGFが見えると云い、Ludin⁸⁾ も溶血した細胞で位相差顕微鏡下に之を見うることから、SGFは細胞内に元からある物質で人工産物ではないと主張した。最近に至つて Braun-Steiner その他、^{9) 10) 11)} Brauner その他¹²⁾ は電子顕微鏡下に網赤血球内にミトコンドリアが存在することを明らかにし、遂に1957年妹尾その他¹³⁾ は電子顕微鏡的観察から、網赤血球内にはミトコンドリアの他に小胞体(E.R) (endoplasmic reticulum) の存在することが明らかにされた。更に同氏等¹³⁾ は超生染後の網赤血球と無処置の網赤血球とを電子顕微鏡下に比較追及して、SGFは色素によつて膨化凝集した小胞体(E.R)がミトコンドリアの周囲に凝集したものであることを明らかにした。妹尾は¹⁴⁾ は又赤血球内ヘモグロビン(H.b)合成の観察から、ヘムの合成はミトコンドリアが行いグロビンは小胞体(E.R)により合成されるであろうと主張した。此の様にして最近迄多くの議論がなされ乍ら、その本体が不明のまま残されていた網赤血球

の内部構造とそのSGF形成の機構更に網赤血球内小器官の構造は明るみに出され、漸く解決されるに至つた。従つて網赤血球が成熟する場合には、此等の小器官はヘモグロビン合成の役目を果たした後消失しやがてヘモグロビンを含む袋即ち正常赤血球になると云うことであり、此の様な成熟過程は試験管内でも起ることが古くから多くの人々により観察されて来た。即ち既に1922年 Pepper¹⁵⁾ はクエン酸ソーダで凝固を防いだ血液中の網赤血球が試験管内で減少することをのべ、その後 Seyfarth (1927)¹⁶⁾ Heath u Daland (1930)¹⁷⁾ Riddle (1930)¹⁸⁾ Heilmeyer u Westhauser (1932)¹⁹⁾ 等も網赤血球の試験管内成熟を観察している。最近では Nizet²⁰⁾、妹尾その他²¹⁾、Plum 等²²⁾ の観察がある。之等の観察は各々の場合の実験条件の相異により必ずしも一致した値には到達していないが、それは主として試験管内に於ては早晚赤血球の変性が起るためであると考えられる。因みに各人の示した網赤血球の試験管内成熟時間をあげてみると、人間の場合、妹尾その他は18時間²³⁾、Riddle¹⁸⁾ は24時間等の短いものから、Seyfarth の実験によれば数日に及ぶと云う。以上の如く見解が種々異り何れが正しいか判断に苦しむ状態である。然し、最近Nizet²⁴⁾ は赤血球のエネルギー代謝が主としてグルコースの無氣的分解によつて行っていることから、グルコースを添加して或る程度変性を防ぐことに成功し、更に妹尾等²³⁾ は赤血球の変性がメトヘモグロビンの産出によつて促進され、又酸素がヘモグロビンに結合したり分離したりする度合が甚しい場合にメトヘモグロビンの産生が増強されると云うことを明らかにしてから、之を防ぐ意味で酸素を加圧して観察し、長時間にわたつて試験管内で赤血球の破壊を起すことなく網赤血球の成熟を観察することに成功し、此の方法によつて妹尾等は家兎網赤血球成熟時間を9時間、人間の場合を17～

18時間と定め、此の値より赤血球の寿命を算定し、此の値がアイソトープを使用しての実験結果 (Pi HA. Shamine u Rippenbery)²⁶⁾ と略々一致した成績に到達しているので、成熟時間の観察は妹尾の方法に依つて略々正しい値が得られたものと考えられる。又一方妹尾²⁶⁾ 等及び Plum²⁷⁾ 等²⁸⁾ は全く別々に網赤血球の成熟物質が肝脾腎胃等に多量に存在することを明らかにした。

両者の方法は全く異なるものであり而も殆んど同じ結果に到達していることは、網赤血球成熟物質が実在するものであることを示している。即ち Plum は赤血球をそのまま試験管内に移し之に血清各臓器の Brei を加えて実験し、本物質が胃粘膜で生産され肝に運ばれて活性化され貯蔵されるとし、此の活性物質としてチロチンその他をあげているが、成熟物質の本体については何等の手掛りも得ていない。

妹尾等が海猿の各臓器を生理的食塩水を加えて Brei とし、その上澄をとつて之を酸素加圧した家兎血液に加えることにより、成熟促進物質が肝脾腎胃その他に含まれることを明かにし、又墨汁による填塞実験²⁹⁾ から網赤血球の成熟物質は網内系細胞に含まれることを明らかにした。然し成熟物質の本体については Plum, 妹尾及びそれ等の協同研究者も何等此を明らかにし得ていない。よつて著者は妹尾等と協力して本物質の究明を企てた。妹尾等はさきに雑草にて飼育した海猿の臓器について視察しているが、私は分析のため大量の材料を得る必要から牛肝を用いて大略満足すべき結果を得たので、本編に於ては牛肝の網赤血球成熟作用に就いて報告する。

II 家族材料及び実験方法

網赤血球観察の材料としては成熟貧血家兎の末梢血液を用いた。即ち体重 2 kg 内外の健康家兎を選び、その血液像が正常範囲内にあることを確めた後、1日 20~30cc 宛 3 日間連続耳静脈より瀉血し、(耳静脈を切断し、電球で耳を温めつつ血液をメスチリンダーにとり量をはかつた) 数日後網赤血球の分利が起つた時期に耳静脈より無菌的に 1.6cc の血液を、あらかじめ 3.8% 枸橼酸ソーダ 0.4cc を入れた注射器にて採血し、そのまま或は遠心沈澱により血清を除くため 20cc の生理的食塩水で数回洗滌後再び生理的食塩水液で元の血液量として赤血球浮游液を網赤血球観察の材料とした。是等は夫々約 0.1cc (1/2 針 1 滴) 宛を直径 1.2 ㎝ 高さ 6.5 ㎝ の滅菌試験管 10~15 本に分注し、次にその試験管外壁の管底を水で濡らして少量の二酸化

マンガンを付着させて、予め用意された直径 2.2 ㎝、高さ 12.5 ㎝ の試験管内に 3% の過酸化水素水を約 2.0cc 入れたものの中に挿入し、手早くゴム栓を施しそのまま 38°C の孵卵器内に入れ、1 時間毎に 1 本宛取り出してその中の網赤血球数を算定した。算定に当つては被検試験管内血液を充分混和した後、Nile blue 超生染法によつて観察した。即ち 1% Nile blue の alcohol 溶液を重クロム酸加里、アルコール、エーテル処理によつて完全に脱脂したオブジェクトグラス上に硝子棒をもつて塗抹乾燥し、湿気を含まないガーゼで強くこすり粗大色素粒子を除き薄膜を作り、別にデツキグラスに極く少量の血液を付着させて、此を色素膜上に伸展し、直ちに狭視野接眼鏡を用いて赤血球を 5,000~7,000 個計算し、その中の網赤血球の全赤血球に対する千分比を求めた。尚 Nile blue 薄膜は塗抹後充分に乾燥した後脱脂乾燥ガーゼにてよくこすり、色素の小顆粒を除かないと血液の伸展が阻害される。

血液は直接オブジェクトグラス上においてはならない。デツキグラスにつける血液の量は常に略々一定になる様に習熟しデツキグラスをオブジェクトグラス上に置く時、赤血球が一層をなしてデツキグラス面に拡がる様にする。血液がデツキグラスの外にはみ出したもの、又血液がデツキグラスの中心部のみにあり軽く圧迫しても周囲に及ばないものは、観察の対照から除外した。オブジェクトグラスは脱脂を充分に行い埃は入念にとることが大切である。不良なる標本は網赤血球の算定に当つて大きな誤差を生ずる。

次に網赤血球の成熟物質を含む材料としては、新鮮な牛の肝臓 200 g をミキサー或はホモゲナイザーにて充分つぶし、その Brei 10 に対し生理的食塩水 90 の割合に加へ低温にて 30 分~1 時間攪拌抽出し、そのエムルチオンを 3,000 g 20 分間に遠心沈澱しその上清をとり使用した。

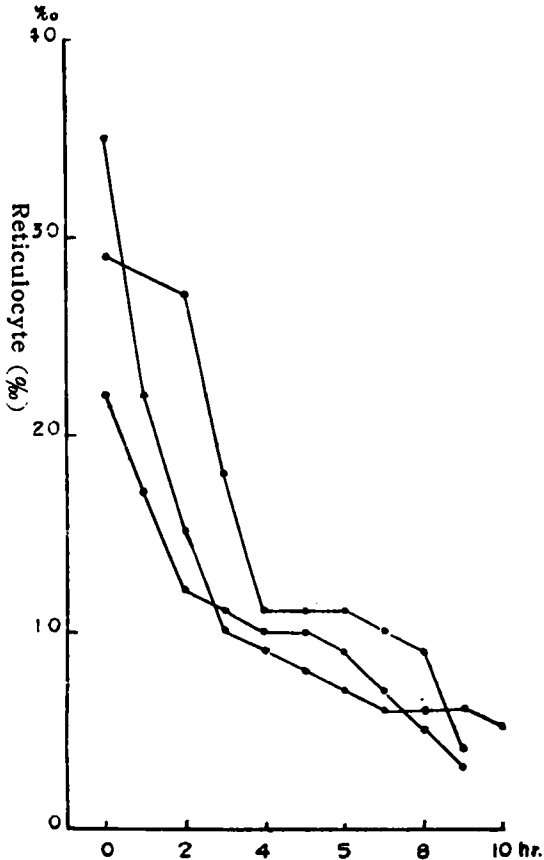
本物質の網赤血球成熟に及ぼす影響を観察するために、上記枸橼酸加血液又は赤血球の生理的食塩水浮游液 4 容に対し 1 容の割合に此の上清を混入したものについて、上述の網赤血球の成熟観察方法に従つて実験を行つた。

次に *in vivo* の実験は前記牛肝エキスエムルチオンを生理的食塩水で抽出し、冷凍超遠心により有形成分を除去し得た乳白な上清液を甕当り 10cc 宛耳静脈より注射し、その後 1 時間毎に末梢循環血液中の網赤血球を前述の網赤血球算定方法に従つて算定した。

III 実験成績

瀉血貧血家兎の静脈血に枸橼酸ソーダーを添加して凝固を防いだものを、上記の方法に従って酸素加圧のもとで38°Cの孵卵器中に保存し、一時間毎にとり出してその中に含まれる網赤血球の数を算定した結果では、図1に示す如く最初の約3時間の間では比較的急

図1 健全家兎酸素加血液に於ける網赤血球の試験管内減少R



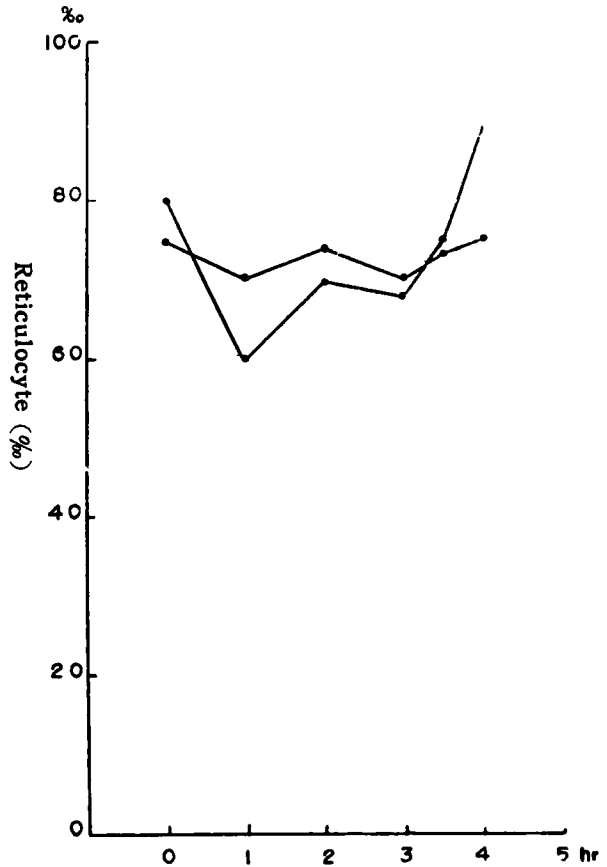
激に減少の傾向が見られるが、その後は比較的緩徐な減少傾向を示し略九時間にして一定の最低値に達する。此の結果はさきに妹尾河合等によつて報告された所と略一致する。

而し家兎静脈血を生理的食塩水で洗滌し、除血漿後生理的食塩水に浮遊させたものに就いて同じ様な実験を行つた場合には、酸素加圧のもとに於ても時間的に網赤血球の減少傾向は殆んど観察されない。即ち最初の1~2時間の間稍減少する傾向を示すが4~5時間経過すると寧ろ増加の傾向が見られる様になる。

(図2)。

次に上記の方法で瀉血によつて網赤血球の分利を起させた他の家兎の血液に、3.8%クエン酸ソーダーを加えて凝固を防止したものに上記の方法で得られた牛肝エキス(血液の1/4量)を加えて同様な方法で酸素加

図2 除血漿家兎血酸素加圧下に於ける網赤血球の試験管内消長の試験管内消長



圧下に網赤血球の消長を観察した所見では、2~4時間で急激に網赤血球の減少して行くのが認められた。

(図3)。

次に上記の方法で得られた牛肝エキスをあらかじめ瀉血して貧血に陥らせ網赤血球の分利を起している家兎の静脈内に体重当り10cc宛徐々に注入した場合には、注射後一時間にして急激に末梢血の網赤血球数が減少して来るのが認められた。然しその後網赤血球数は再び増加の傾向を辿るものが多かつた。網赤血球は注射3時間後何れも不活発となり数時間後に斃死した(図4)。

IV 考 按

以上の実験成績に於て明かな如く、家兎網赤血球は枸橼酸ソーダーを加えて酸素加圧した場合に血球の破壊を来す事なく試験管内で成熟する。観察結果は妹尾河合等の観察結果と略一致する。即ち貧血家兎に於て九時間前後で一定値に達する。此の成熟が血漿内の成熟物質によつて起る事は生理的食塩水に赤血球を浮遊させたものに於ては殆んど成熟現象が認められない事

図3 生理的食塩水にて抽出した牛肝エムルチオン上清を家兎血液に添加し酸素加圧下に於ける網赤血球の試験管内減少

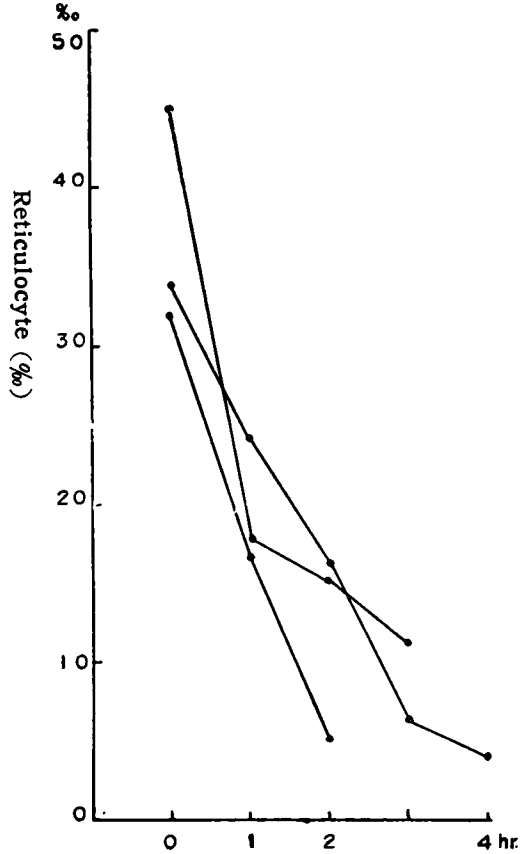
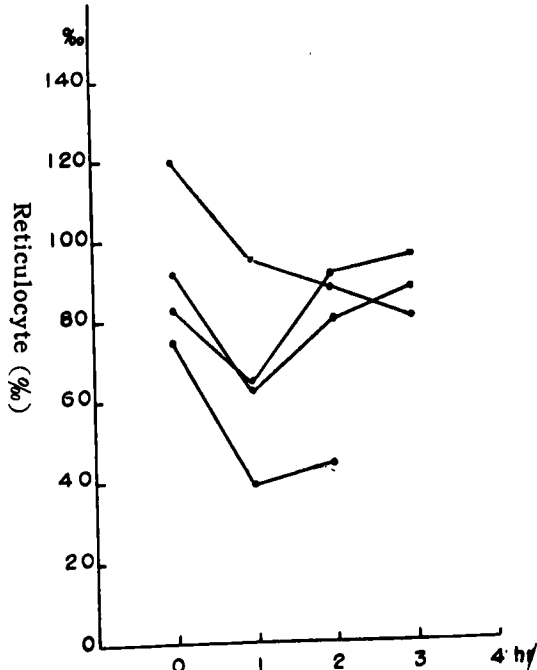


図4 生理的食塩水で抽出した牛肝エムルチオンの Supernatant を 珪当り10cc宛注射後に於ける末梢循環血中の網赤血球の消長



からして明かである。血漿を除いた場合にも最初多少その数が減少する様な傾向が認められるのは、Plumの云う様に赤血球そのものの中にも多少の成熟物質が含まれている事を示すものかも知れない。その成熟化傾向が最初の1~2時間のみに僅かに見られる点は特にその感を深くする。貧血家兎のクエン酸加血液に牛肝エキスを加えた実験では、明かに牛の肝に家兎の網赤血球を成熟せしめる作用が存在することを示している。此はさきに妹尾河合等が海猿の肝に就いて行つた実験と大略同じであつた。即ち網赤血球は牛肝エキスの添加の場合妹尾河合が行つた海猿肝エキス添加の場合と同様に2~4時間で殆んど最低値に達した。

次に肝のエキスを大量に貧血家兎の静脈内に注入した後も、一過性に末梢血中の網赤血球が急激に減少することを認めた。牛肝エキスを静脈内に注射した家兎は、何れも2~3時間後に死亡したがその死因については現在不明のまま残されている。然し脂肪栓塞の如きものではなかつたかと判断されるが剖検の機会を失したためその原因の究明は今後行う積りである。然し試験管内に於て肝エキスを加えた場合の網赤血球の成熟状態からみて此の生体内網赤血球の減少もその成熟現象と考えてよいものであろう。

以上の事実は牛肝を用いればその材料の豊富な点で成熟物質を化学的に可成の量で取出せる可能性を示している。

V 結 論

1) 貧血家兎の血液をクエン酸ソーダーを加えて凝固を防止し、之を酸素加圧のもとに38°Cの孵卵器中に保つ場合網赤血球は時間的にその数を減じ最初稍速かに後緩やかに大略九時間にして最低値に達する。

2) 枸橼酸曹達加血液を生理的食塩水で洗滌しその血漿を除去すると、38°C酸素加圧下での網赤血球の成熟は最初の1~2時間を除いて殆んど見られなくなる。

3) 牛肝の生理的食塩水添加エムルチオンの上清を貧血家兎枸橼酸加血液に添加すると、網赤血球の成熟が促進され酸素加圧下の観察では大略2時間で完全に成熟する。

4) 瀉血貧血家兎に牛肝エキスの大量 10cc/kg を静脈内に投与する場合、一時的に急激に末梢血中の網赤血球の減少を来す。

5) 以上の事実から牛肝内にも網赤血球成熟物質が存在する事が結論された。

稿を終るに當り、始終御懇篤なる御指導と御校閲を

賜つた恩師妹尾教授に深甚なる謝意を表します。猶御助言を戴いた小田助教授並に御助力を下された粟井内海両先生に心から感謝の意を表します。

猶本論文の要旨は第480回岡山医学会に於て発表した。

文 献

- 1) Caspersson, T.O., *Scandinawisch Arch für Physiol. Berlin u Leipzig* 1936 (Sup Nr 8, Bd. 73)
- 2) Dustin, P. (Tr) : *Symposia Societ. Exptl. Biol.*, 1, 114, 1947.
- 3) Seno, S., Kanda, S., and kawai, K., *Trans. Societ. Pathol. Japan*, 41, E, 83, 1952.
- 4) Seno, S., Kanda, S., et al. : *Mie Med. J. IV Suppl.*, 1, 45, 1953.
- 5) Seno, S. : *Hondb., gesamt : 1, Vzban, München* 1957.
- 6) Simmel, H. : *Verh, deutsch Ges inn Med*, 36, 144, 1924.
- 7) Simmel, H. : *Folia haemat.*, 32, 97, 1926.
- 8) Lüdin, H. : *Schweiz Med. Wschr.*, 79, 842, 1947.
- 9) Braunsteiner, H., Fellingner, K. and Pukesch, F. : *acta haemat*, 16, 332, 1956,
- 10) Braunsteiner, H., und Bernhard, W. . *Acta haemat.*, 3, 167, 1950.
- 11) Braunsteiner, H., TR. et al. : *experientia*, 12, 255, 1956.
- 12) Brauner, H. TR. and Vallego-Freire, A. : *Experi cell Red*, 10,55, 1956.
- 13) Seno, S., et al., : *Acta haemat Japan*, 20, 317, 1957.
- 14) 妹尾, 内海 : *日血雑誌 (投稿中)* 昭33.
- 15) Pepper, O. H. P. : *Hvch, int. Med.* 30, 801, 1922.
- 16) Seyfarth, C, and R. Jürgens., *Virchow. Arch. f. Path. Arct*, 266, 676, 1928.
- 17) Heath, C.W., and Daland, G.A. : *Arch. int. Med.*, 46, 532, 1939.
- 18) Riddle, M. D. Mutthew. C. : *Arch. int. Med.*, 41, 417, 1930.
- 19) Heilmeyer, L. and West hauser, L., : *Ztschr. klini. Med.*, 121, 361, 1932.
- 20) Nizet, A. and Robscheit-Robbins F. S., : *Blood*, 4, 648,1950.
- 21) Seno, S., Kawai, Kuse, Nishikawa, Seo, *Transct, Soci Pathol. Japan*, 38, 174, 1949.
- 22) Plum, C. M. Amer, J. of obsteristics and Gyvecol. 62, 1, 1951.
- 23) 妹尾 : *細胞化学会シンポジウム, 第一集, 昭28.*
- 24) Nizet, : *Compt. rend.Soci de biol*, 140, 1077, 1946.
- 25) London, J. M. Shemin, D., Wert, R. & Ritzenberg, R. : *Biol chem.*, 179, 463, 1949.
- 26) 妹尾 : *網状赤血球, 生体の科学, 2巻, 25, 72, 昭25.*
- 27) Plum. C. M., and Jacobsen. E., *Acta physiol Scand* 278, 272, 4, 1942.
- 28) Plum. C. M. and Jacobsen. E., *I biden*, 1, 5, 1943.

Studies on Reticulocyte Ripening Substances

Part 1. The Action of Bovine Liver Extract on the Maturation of Reticulocytes in Rabbits

By

Hiroshi SANADA

Department of Pathology, Okayama University Medical School, Okayama, Japan

According to the method devised by Seno and others the mode of maturation of reticulocytes of anemic rabbits have been observed in vitro with or without addition of the emulsion of bovine liver. The observations prove that the supernatant of the liver emulsion has the ability to accelerate the maturation of the reticulocytes showing complete maturation by about two hours in the oxygenated blood where the supernatant is added, while it takes about 9 hours under the same condition without addition of the supernatant. Intravenous introduction of a large dose of the supernatant into the anemic rabbits results in a temporary and rapid decrease of reticulocytes in circulating blood. These observations indicate that the ripening substances like that in guinea pig liver found by Seno and others likewise exist in the bovine liver.
